

POWERED BY **Dialog**

Basic Patent (Number,Kind,Date): JP 48056894 A2 730809

PATENT FAMILY:

Japan (JP)

Patent (Number,Kind,Date): JP 48056894 A2 730809

Priority (Number,Kind,Date): JP 7190578 A 711115

Applic (Number,Kind,Date): JP 7190578 A 711115

Derwent WPI Acc No: * C 73-68012U

Language of Document: Japanese

Patent (Number,Kind,Date): JP 74012720 B4 740326

Priority (Number,Kind,Date): JP 7190578 A 711115

Applic (Number,Kind,Date): JP 7190578 A 711115

CA Abstract No: * 79(23)135295B

Language of Document: Japanese

INPADOC/Family and Legal Status

© 2004 European Patent Office. All rights reserved.

Dialog® File Number 345 Accession Number 895544

POWERED BY **Dialog****Bredinin prodn - novel antibiotic****Patent Assignee: TOYO BREWERY CO LTD****Patent Family**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 48056894	A					197345	B
JP 74012720	B	19740326				197416	

Priority Applications (Number Kind Date): JP 7190578 A (19711115)**Abstract:**

JP 48056894 A

A new antibiotic Bredinin (I), was produced by a new isolate taxonomically identified as *Eupenicillium brefeldianum* M-2166 (II, FERM-P 1,104). II or other I producing microbe belong to *Eupenicillium* was cultured in/on the ordinary medium, liq or solid, at 26-30 degrees for 40-70 hrs. I in the cultured supernatant was adsorbed on a strong basic anions exchange resin (e.g. Amberlite IRA-411, OH-type), eluted with is approx. 2% HOAc, and pptd. with MeOH and (Me)₂CO. I was further purified by silica gel (III) and DEAE-Sephadex A-25 column chromatogs. and crystn with MeOH.

Derwent World Patents Index

© 2004 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 990730

(2000円)

特 許 願

昭和46年11月15日

特許庁長官 井 土 武 久 殿

1. 発明の名称

新抗生物質ブレディニンの製造法

2. 発明者

住 所 静岡県田方郡大仁町三福 3 / 4
氏 名 水 野 公 雄 (ほか4名)

3. 特許出願人

住 所 郵便番号 410-23
静岡県田方郡大仁町三福 632の1
名 称 東 洋 醸 造 株 式 会 社
代表者 小 川 三 男

4. 代理人

住 所 郵便番号 171
東京都豊島区南池袋二丁目1番5号(英ビル)
氏 名 (6946) 弁理士 坂 田 順 一
電 話 (984) 2023



明 細 書

1. 発明の名称 新抗生物質ブレディニンの製造法
2. 特許請求の範囲

オイベニシリウム属に属する抗生物質ブレディニン生産菌を培地に培養し、その培養物から抗生物質ブレディニンを採取することを特徴とする新抗生物質ブレディニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新抗生物質ブレディニン (Bredinin-) の製造法に関する。

本発明者らは、東京都八丈島の山林土壌より分離したオイベニシリウム (Eupenicillium) 属に属する糸状菌 M-2166 が、その培養物中に抗ウイルス性、抗腫瘍性、およびキヤンジダ・アルビカンスに対し特異的に不完全発育阻止を示す核酸関連物質である新抗生物質を生産することを発見し、該抗生物質をブレディニンと命名した。

①9 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 48-56894

④3公開日 昭48.(1973) 8. 9

②1特願昭 46-90578

②2出願日 昭46.(1971)11.15

審査請求 有 (全8頁)

庁内整理番号

⑤2日本分類

671249
622444

36(2)0911
30 A32

上記の糸状菌 M-2166 の肉眼的および顕微鏡的観察に基く各種培地上における培養の特徴は次に記載する通りである。

A. 肉眼的観察

①ツアベック寒天培地

26℃で、培養10日間で直径4.3~4.5mmの生育を示し、その集落表面は、培養初期には白色の綿毛状で、7日以後子のう果が形成されるにつれて綿毛状は次第に衰え、バンブー(2gc)~パッティ(1/2 eu)の顆粒状が顕著になる。菌叢は比較的薄く平坦であり、放射状に皺ができる。分生子世代は作るが少なく、集落の性状に影響を与えない。子のう果は作るが、比較的少なく顆粒状をしている。集落の裏面はビスク(3ee)である。

浸出液は僅かに出すが透明であり、拡散性色素は出さない。

37℃での生育は26℃の場合と似ているが、

子のう果の形成が悪くなり気菌糸が多くなる。

② 麦芽寒天培地

26℃で生育は速く、10日間培養して67～70mmになり、その集落表面は、培養初期には白色綿毛状で、7日以後子のう果が形成されるにつれて綿毛状は次第に衰え、ライトウイート(2ea)の顆粒状が顕著になる。菌叢は薄く平坦である。分生子世代は少なく集落の性状に影響を与えない。子のう果の形成は非常によく、寒天の表面に顆粒状の層となる。集落の裏面はライトウイート(2ea)である。

浸出液および拡散性色素は出さない。

37℃での発育は26℃の場合と似ているが、子のう果の形成が悪くなり気菌糸が多くなる。

③ ポテトグルコース寒天培地

26℃で生育は速く、10日間培養して73～75mmになり、集落表面は、培養初期には白色綿

毛状で、7日以後子のう果が形成されるにつれて綿毛状は次第に衰え、パールピンク(3ca)となり、周辺部はビスク(3ec)となり、顆粒状が顕著になる。菌叢は比較的薄く平坦であるが、集落中心部より僅かに放射状の溝を生ずる。分生子世代は少なく集落の性状に影響を与えない。子のう果の形成はよく、寒天の表面に顆粒状の層となる。集落の裏面はライトアイボリー(2ca)である。

浸出液および拡散性色素は出さない。37℃での生育は26℃の場合と似ているが、子のう果の形成が悪い。

④ オートミル寒天培地

26℃での場合、生育速度、集落の性状共に麦芽寒天培地の場合と殆んど同じである。

37℃の場合も同様である。

(注) 色の表示記載は1958年コンテナ・コーポレーション・オブ・アメリカ(Container

Corporation of America)発行「カラー・ハーモニー・マニュアル(Color Harmony Manual)」の表示法に従った。

B. 顕微鏡的観察

ペニシラスは単輪生状。分生胞子柄は多く気菌糸より分岐してでき、長さは100μ以内、巾は2～2.5μ、壁は滑面、無色。梗子は単独に生ずるかまたは3～5個群生、7～10×2～2.5μ、トックリ状で先端が次第に細くなる。

分生胞子は亜球形または卵形、2.5～3×2～3μ、壁は滑面、無色。子のう果は一般に球形であるが、多少角のあるものがある。直径50～200μ、比較的厚い膜性の菌核様の壁からなり、壁の細胞は直径4～15μで不規則な形で、色は黄褐色。子のうは8胞子、淡いオリーブ色、球形または亜球形、7～10×6～8μ。子のう胞子はレンズ状、粗面、3～4×2.5～3.5μ、淡い

オリーブ色。

C. 生育条件

生育のPHは4～11、温度は18～42℃で、最適生育のPHは6～7、温度は26～30℃である。

上記の詳しい観察の結果、本菌は1933年ドッジ(Dodge)によつて報告されたペニシリウム・ブレフエルディアナム(Penicillium brefeldianum)の菌学的性状(Raper K. B., A Manual of the Penicillia, 141頁, 1949年)と全く一致したが、ペニシリウム・ブレフエルディアナムは1967年ストーク(Stolk)とスコット(Scott)により完全世代名優先という思想に基いてオイペニシリウム・ブレフエルディアナム(Eupenicillium brefeldianum)に移されたため(Stolk A. C., Persoonia, 4巻, 391頁, 1967年)、本菌はオイペニシリウム・ブレフエルディアナムに属す

る菌であると同定され、オイベニシリウム・ブレフェルディアナム M-2/66 (Eupenicillium brefeldianum M-2/66) と命名した。さらにこの菌は工業技術院微生物工業技術研究所に「微工研菌寄第1104号 (FERM-P No. 1104)」として寄託されている。

本発明は、上記の知見に基いて完成されたものであつて、オイベニシリウム属に属する抗生物質ブレディニン生産菌を培地に培養し、その培養物から抗生物質ブレディニンを採取することを特徴とする新抗生物質ブレディニンの製造法である。

本発明方法における使用菌としては、上記のオイベニシリウム・ブレフェルディアナム M-2/66 はその一例であつて、この菌だけでなくオイベニシリウム属に属する菌で抗生物質ブレディニン（以下単にブレディニンと称す）を生産する菌はすべて本発明方法において使用することができる。

炭素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばコーン・スチープ・リカー、大豆粉、綿実粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、酵母、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛、鉄、マンガン等の塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育しブレディニンを生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましいのは26〜30℃である。培養時間は条件によつて異なるが、通常40〜70時間程度であつて、ブレディニンが最高力価に達する時期をみはからつて適当な時期に培養を終了すればよい。

かくして得られたブレディニン生産菌の液体培養の培養物中においてブレディニンは液体部分のみで菌体^{含む}を固体中には含有されない。

なおオイベニシリウム属の菌は完全世代名優先という点で不完全世代のベニシリウム属の菌より区別されるが、オイベニシリウム属の菌で完全世代を失つた菌であつてもブレディニンを生産する菌であれば本発明方法に使用することができる。

本発明を実施するに当つては、オイベニシリウム属に属するブレディニン生産菌を抗生物質を生産する通常の方法で培養する。培養の形態は液体培養でも固体培養でもよいが、工業的にはブレディニン生産菌の孢子懸濁液または2〜3日間培養した培養液を生産用培地に接種し、深部通気攪拌培養を行なうのが有利である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばブドウ糖、ショ糖、乳糖、麦芽糖、デンプン、デキストリン、糖蜜、グリセリン等が使用される。窒

このようにして得られたブレディニン生産菌の培養物あるいはこれから固形分を除去した培養液からブレディニンを採取するのであるが、ブレディニンは水溶性物質であり、ほとんどの有機溶媒に難溶性であつて、特に非親水性有機溶媒には不溶性であることから有機溶媒による抽出は困難である。従つて工業的にはブレディニンが弱酸性物質であること、あるいは有機溶媒に難溶性であることなどの特性を利用した分離精製法で行なうことが有利であり、生産されたブレディニンはキャンジダ・アルビカンスを被験菌として通常のカップ法により定量される。

ブレディニンの分離精製手段の1例を示すと次の如くである。すなわちブレディニン生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去した培養液を PH 9.0 に調節し、強塩基性陰

2価 イオン交換樹脂例えばアンバライトIRA-4/1

・化学的性質について述べると次の通りである。

(OH型)で処理して有効物質を吸着させる。ついで約2%の酢酸水で溶出処理し、さらにこの溶出液は濃縮と精製のため強塩基性陰イオン交換樹脂に再吸着、溶出を行なつてもよく、得られる活性分画を減圧濃縮して油状の残渣を得て、これにメタノールおよびアセトンを加えて灰白色の粉末を得る。さらにシリカゲルカラムにかけて展開し、得られる紫色の活性分画を集めて減圧濃縮乾固したのち、これを水に溶解し硫化水素ガスを飽和させてキレートしている培地由来の金属を硫化物として分別する。さらにまた精製するため、少量の0.1Mピリジン-酢酸緩衝液に溶解し、この溶液をDEAE-セフアデックスA-25のカラムを通してカラムクロマトグラフィーを行い、得られる溶出液の活性分画からメタノールを用いて結晶化させ、白色のブレディニンの結晶を得る。

本発明方法により得られるブレディニンの物理

1. 元素分析値

C : 41.70 H : 5.06
N : 16.21 O : 37.03

2. 分子量および分子式

実測値 265 (滴定当量)

計算値 259.22



3. 融点

200℃以上で褐色分解

4. 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = -35^\circ$ (C=0.8, H₂O)

5. 紫外線吸収スペクトル

水溶液中で測定したブレディニン(濃度10 μ /ml)の紫外線吸収スペクトルは第1図に示す通りであつて、 λ_{max} : 245m μ $E_{1\%}^{1cm} = 250$, 279m μ $E_{1\%}^{1cm} = 580$ に極大吸収を有する。

6. 赤外線吸収スペクトル

KBr法によるブレディニンの赤外線吸収スペクトルは第2図に示す通りであつて、3420、3130、2925、2770、1625、1540、1445、1300、1260、1195、1030、1100、1080、1055、980、873、829、770、740、725、560cm⁻¹の各波数に吸収帯を有する。

7. 核磁気共鳴スペクトル

重ジメチルスルホキサイド中100MHzにおけるブレディニンの核磁気共鳴スペクトルは第3図に示す通りである(内部基準, TMS)。

8. 呈色反応

塩化第2鉄反応、モーリツシュ反応、過マンガン酸カリウム反応、パウリ反応、エールリツヒ反応に陽性を示し、トレンス反応、フェーリング反応、ドラグendorff反応、ライドン-スミス反応、イサチン反応、坂口反応、ニンヒドリン反応に陰

性を示す。

9. 溶剤に対する溶解性

水に易溶、メタノールに多少溶解、エタノールに難溶、通常の有機溶媒に不溶である。

10. 塩基性、酸性、中性の区別

弱酸性(pKa 6.75)

11. 物質の色

白色

12. Rf値

① ペーパークロマトグラフィー(東洋ろ紙No.51)

n-ブチルアルコール:酢酸:ピリジン:水

(15:3:10:12)でRf値0.52。

n-プロピルアルコール:酢酸:ピリジン

:水(15:3:10:12)でRf値0.63。

② シリカゲル薄層クロマトグラフィー(メル

ク社製キーゼルゲルG)

n-ブチルアルコール:酢酸:水(3:1:1)

で Rf 値 0.45。

13. 安定性

PH 2~9, 60℃, 30分で不活化されない。

本発明方法で得られるブレディニンは、強い抗ウイルス性、抗腫瘍性およびキャンジダ・アルビカンスに特異的に不完全発育阻止を示し、モーリッシュ反応陽性および核磁気共鳴スペクトルのパターンから五炭糖一分子を含む核酸関連物質と推定される。なお核酸関連物質であるピラゾマイシン〔Chemical and Engineering News, Sept. 1963 頁(1963)〕はブレディニンと同一分子式を有すが、ピラゾマイシンの標品と直接比較すると、水溶液における λ_{\max} : 225 mμ $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 34$ 、266 mμ $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 269$ の紫外線吸収スペクトルおよび n-ブチルアルコール：酢酸：水(3:1:1)におけるシリカゲル薄層クロマトグラフィー(メルク社製キーゼルゲル G)で Rf 値 0.55

新規な抗生物質である。

次に、ブレディニンの生物学的性質について述べる。

1. 抗菌性

一般細菌類に対し全く無効であるが、キャンジダ・アルビカンスに対し不完全阻止を示す。キャンジダ・アルビカンスを被験菌とした通常のカップ法で、100 mcg/ml の濃度で 25 mm の阻止円を示した。

2. 急性毒性

マウス静脈内投与による急性毒性試験では、250 mg/kg 投与しても毒性を示さず。

3. 各種組織培養細胞に対する毒性

HeLa - S3 細胞	20 mcg/ml
L 細胞	0.8 mcg/ml
ME (Mouse Embryo) 細胞	100 mcg/ml

HeLa 細胞、L 細胞および ME 細胞は次に述べる方

特開 昭48-56894(5)

を示すことより明らかに区別される。

さらに本生産菌の不完全世代であるベニシリウム・ブレフェルディナムが生産すると報告されている代謝物としてはパリタンチン〔Palitantin: Harri E., et al, Helv. Chim. Acta 46 / 235 (1963)〕、グリセオフルビン (Griseofulvin)、フルビン酸〔Fulvic acid: Oxford A. E., et al, Biochem. J., 33 240 (1939)〕、ブレフェルディン (Brefeldin) A および B〔Helv. Chim. Acta 46 / 235 (1963)〕、フレクエンチン〔Frequentin: Helv. Chim. Acta 46 / 235 (1963)〕が知られているが、これらはすべて分子中に窒素元素を含有しないことから容易に区別され、さらにまたブレディニンの物性、特に特徴的な紫外線吸収スペクトルのパターンから類似物質を検索したが該当するものがなく、従つてブレディニンは従来知られている物質と全く異なる

法にて培養した。

イーグル・ミニマム・エッセンシャル・メディウム (Eagle Minimum Essential Medium) に、トリプトースホスフェートブロス (Tryptose phosphate broth) 1.0%、仔牛血清 5% を加えて増殖培地とし、これに各種細胞を接種して、この細胞が単層に増殖するまで培養した後、2% の仔牛血清の維持培地に移す。

得られたこの細胞にブレディニンを投与して、各細胞に対する毒性を顕微鏡的に調べたものである。

3. 抗ウイルス活性

上記の方法で培養した ME 細胞に、各濃度に希釈したブレディニンを投与して 24 時間後、100 TCID₅₀ (Tissue culture infective dose 50) のワクシニアウイルス (Vaccinia virus) IHD 株を接種し、3 日後にウイルスの起す細胞変性を指標にしてブレディニンの効果を判定した結果、

強い抗ウイルス活性を示した。

mcg/ml	100	20	4	0.8	0.16	0.03	0.000
ウイルス	-	-	-	±	++	++	+++

- : ウイルス増殖阻止効果を有する。

± : ウイルス増殖阻止効果が不明瞭である。

++ : ウイルス増殖阻止効果がない。

4. 抗腫瘍性活性

BDF1系の雄のマウス(1群5匹)を用いて、リンパ性白血病(L-1210)を10⁶個を腹腔内接種し、24時間後より1日1回5日間各濃度でブレディンを投与した結果、無処置群に対し延命効果が認められた。

投与量 (mg/kg/日)	結 果 (死)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
100	-	-	-	-	-	-	0/5	3/5	2/5		
20	-	-	-	-	-	-	0/5	3/5	1/5	-	1/5
4	-	-	-	-	-	-	1/5	4/5			
0.8	-	-	-	-	-	-	3/5	1/5	-	-	1/5
無処置群	-	-	-	-	-	-	5/5				

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれにより制限を受けるものではない。

実施例1

グルコース2%、ジャガイモ抽出液(ジャガイモ薄片300gに水1ℓを加えて1時間煮沸抽出したもの)1.0%、フアーメディア(綿実粉、トレイダーズ・オイル・ミル社製)0.5%、KH₂PO₄ 0.5%、MgSO₄・7H₂O 0.25%を含有する培地(PH 6.5)100mlを500ml容三角フラスコに

分注し、120℃で15分滅菌する。これにオイベニシリウム・ブレフエルディアナム M-2166(FERM-P No.1104)の胞子を接種し、26℃で48時間、毎分300回転で振盪培養を行ない、これを上記と同一組成の培地20ℓを有する30ℓ容ジャーファーマンターに移植し、26℃で毎分300回転、毎分20ℓの無菌空気を送り、49時間通気攪拌培養を行なつてブレディン35mcg/mlを含有する培養液(PH 4.8)を得た。この培養液より後記実施例3または4に記載の如くにしてブレディンを採取する。

実施例2

グルコース2%、ペプトン1%、コーン・ステープ・リカー1%、KH₂PO₄ 0.2%、MgSO₄・7H₂O 0.1%、消泡剤としてジスホーム BO-5/Y(日本油脂社製)0.1%を含有する培地(PH 6.5)200ℓをステンレス製250ℓ容酸酵タンクに

入れ、120℃で30分滅菌した後、実施例1と同一条件でジャーファーマンターで24時間培養して得られた培養物20ℓを無菌的に移植し、26℃で毎分350回転、毎分200ℓの無菌空気を送り、55時間通気攪拌培養を行ないブレディン50mcg/mlを含有する培養液(PH 5.9)を得た。この培養液より後記実施例3または4に記載の如くにしてブレディンを採取する。

実施例3

実施例2で得た培養物200ℓを50%水酸化ナトリウムでPH 9.0に調節した後、ろ過して清澄な濾液170ℓを得た。この濾液を、20ℓのアンバーライトIRA-411(OH型)(ローム・アンド・ハース社製)のカラム(内径1.5cm)に毎分300mlの流速で吸着させた後、50ℓの水で洗浄する。次いで2%酢酸水を用いて5ℓずつ溶出分画して、キャンジダ・アルビカンスを被験菌

として活性分画を調べたところフラクション7〜9に活性分画が得られた。この活性分画を集め、さらに50%水酸化ナトリウムでPH 9.0に調節後、アンバーライトIRA-4/1(OH型)4Lのカラム(内径7.5cm)に吸着させ、水洗し、2%酢酸水で500mlずつ分画したところフラクション13〜18に活性分画が得られた。この活性分画を集め減圧下濃縮して油状の残渣20.0mlを得た。これにメタノール400ml、次いでアセトン200mlを加えて攪拌し、有効物質を沈澱せしめ、3000rpmで10分間遠心分離し、次いでこれをアセトンで洗浄後、真空乾燥して灰白色のブレディニン粗粉末5.0g(純度10%)を得た。

実施例4

n-ブチルアルコール：酢酸：水(10:1:2)の混合溶媒を用いて詰めた500mlのシリカゲル(関東化学社製60〜80メッシュ)カラム(内

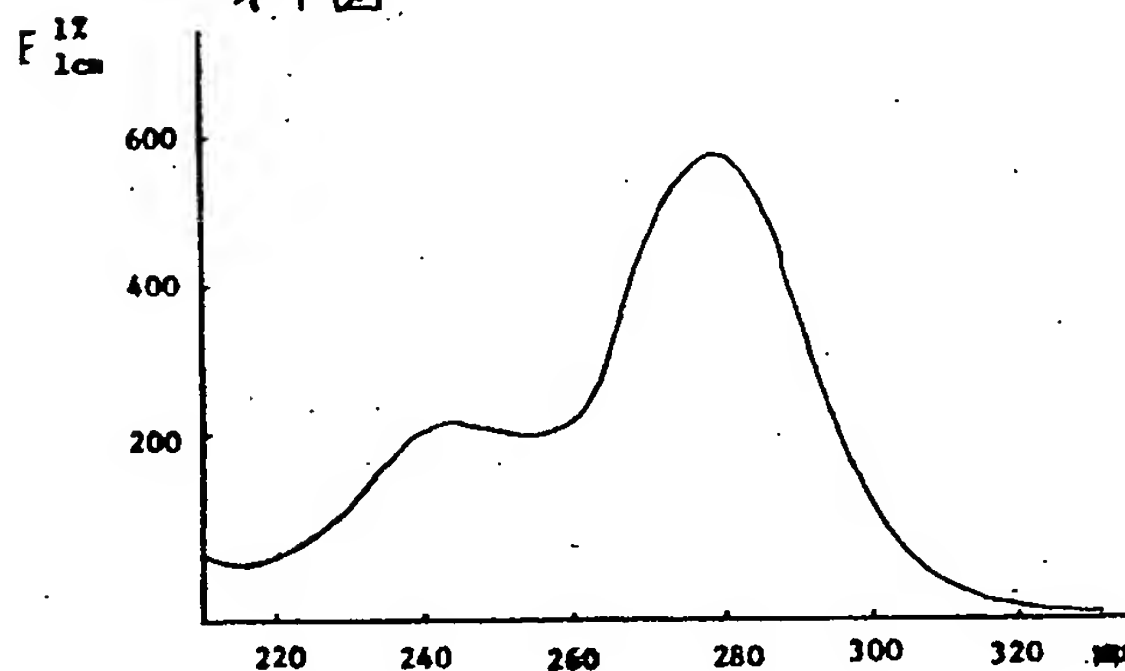
径4.0cm)に実施例3で得た粗粉末を少量の水に溶解し、上記混合溶媒100mlに懸濁して注加し、同溶媒で展開し100mlずつ分画するとフラクション5〜7に紫色を呈する活性分画が得られた。この活性分画を集めて減圧濃縮乾固して暗青紫色の粉末14.3g(純度26%)を得た。さらにこの粉末は、培地中に含有されていた金属をキレートしているため、この粉末を100mlの水に溶解し、硫化水素ガスを飽和させて流化物として分別し、再度乾固する。次いでこの固形物を0.1Mピリジン-酢酸緩衝液(PH 6.0)10mlに溶解し、同緩衝液で緩衝化した400mlのDEAE-セファデックスA-25のカラムクロマトグラフィー(内径2cm)に付し、同緩衝液で10mlずつ分画するとフラクション70〜135に活性分画が得られた。この活性分画を集めて減圧濃縮乾固して1.8gの白色粉末(純度90%)を得、さらにこ

れを熱メタノールから結晶化してブレディニンの白色結晶7.1gを得た。

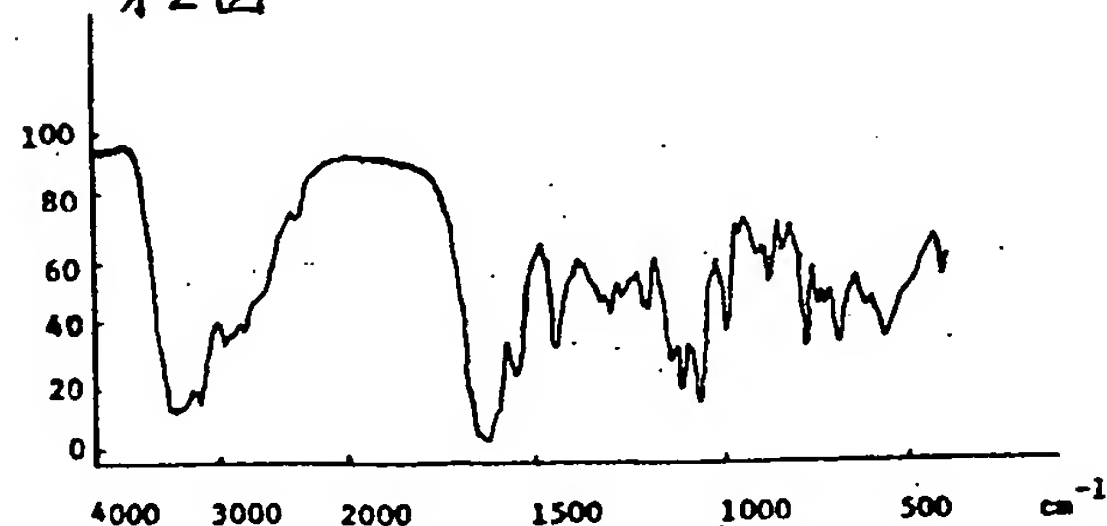
4. 図面の簡単な説明

第1図はブレディニンの紫外線吸収スペクトルを示し、第2図はブレディニンの赤外線吸収スペクトルを示し、第3図はブレディニンの核磁気共鳴スペクトルを示す。

第1図



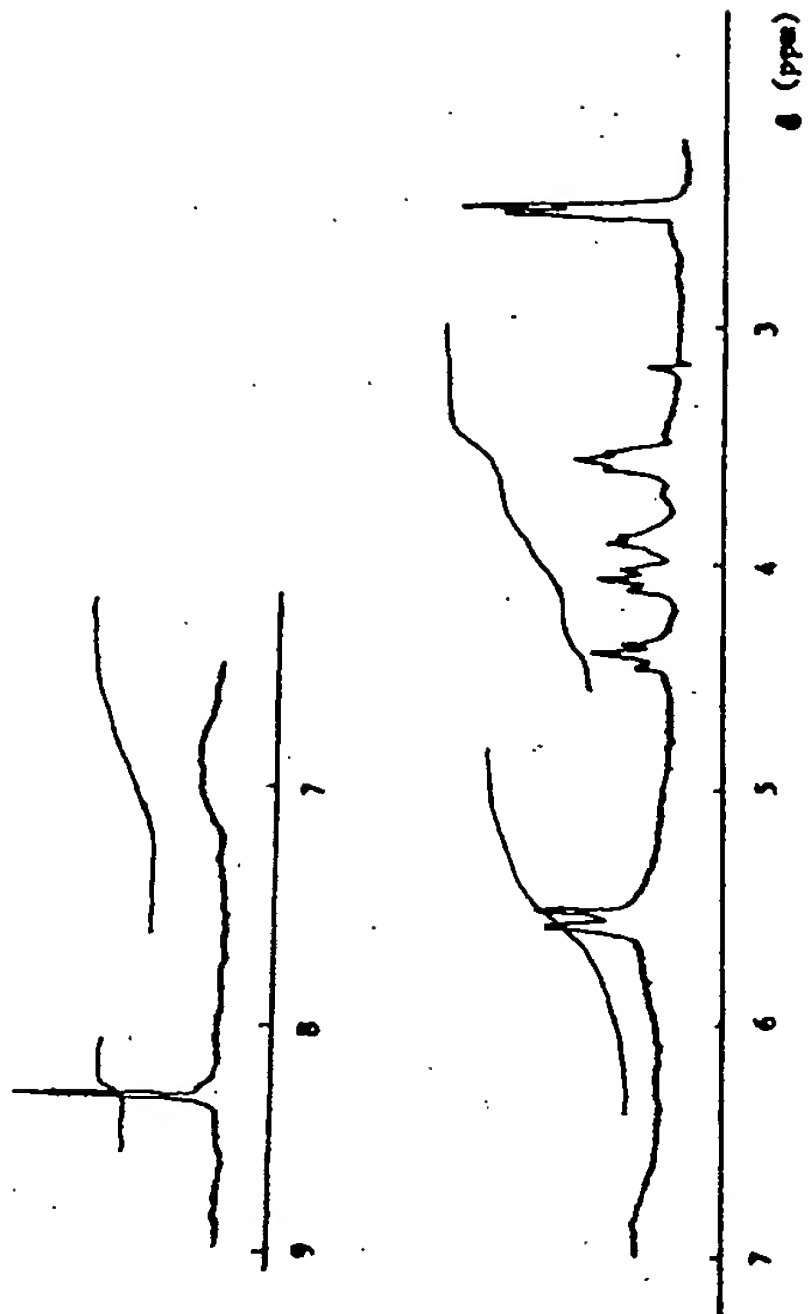
第2図



出願人 東洋醸造株式会社

代理人 弁理士 坂田 順一

図3



5. 添附書類の目録

- | | |
|-------------------|-----|
| (1) 明細書 | / 通 |
| (2) 図面 | / 通 |
| (3) 微生物受託番号通知書(写) | / 通 |
| (4) 委任状 | / 通 |
| (5) 願書副本 | / 通 |
| (6) 出願審査請求書 | / 通 |

6. 前記以外の発明者

住所 静岡県田方郡大仁町三福 632 の /
氏名 渥美 清夫

住所 静岡県田方郡莚山町四日町 463
氏名 高田 正樹

住所 静岡県田方郡大仁町吉田 774
氏名 安藤 拓司

住所 静岡県田方郡大仁町田京城 557 の / /
氏名 阿部 仁之助